

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

张洪^{1*}, 宋娟^{1,2}, 谭晔^{1,2}, 詹新安^{1,2}

(1. 武汉大学人民医院药学部, 湖北 武汉 430072; 2. 武汉大学药学院, 湖北 武汉 430072)

[摘要] 目的: 观察枳椇子乙酸乙酯提取物胶囊对大鼠肝微粒体细胞色素 P450 及其同工酶的影响。方法: 大鼠分别灌服给予枳椇子乙酸乙酯提取物胶囊相当于生药量 0.14 g/kg, 0.17 g/kg 和 0.2 g/kg, 连续 10 d, 用紫外分光光度法测定细胞色素 P450 及其同工酶的活性。结果: 枳椇子乙酸乙酯提取物胶囊对细胞色素 P450 及 NADPH-细胞色素 C(P-450) 还原酶含量无显著影响; 可抑制苯胺羟化酶活性, 抑制率可达 31.5%; 可增加氨基比林 N-脱甲基酶活性, 可达 42.4%; 而对红霉素 N-脱甲基酶的活性没有明显影响。结论: 枳椇子乙酸乙酯提取物胶囊对大鼠肝细胞色素 P450 NADPH-细胞色素 C(P-450) 还原酶及红霉素 N-脱甲基酶无明显作用, 但对氨基比林 N-脱甲基酶活性及苯胺羟化酶活性有显著影响。

[关键词] 枳椇子; 乙酸乙酯提取物; 细胞色素 P450

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2007)03-0037-03

Effects of the Ethyl Acetate Extract of Semen Hoveniae on Liver Microsomal Cytochrome P450 System in Rats

ZHANG Hong^{1*}, SONG Juan^{1,2}, TAN Ye^{1,2}, ZHAN Xin-an^{1,2}

(1. Renmin Hospital, Wuhan University, Wuhan 430060, China;

2. Department of Pharmacy, Wuhan University, Wuhan 430072, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of the ethyl acetate extract of Semen Hoveniae capsule on liver microsomal cytochrome P450 system in rats. **Methods:** The rats were given orally the extract in the doses of 0.14 g/kg, 0.17 g/kg and 0.2 g/kg (equivalent to the crude herb) for 10 days respectively. The activities of cytochrome P450 enzymes were measured by UV chromatography. **Results:** The cytochrome P450 content, NADPH-Cyt C reductase activities and erythromycin N-demethylase activities were not affected; Aniline hydroxylase activities in liver were decreased by up to 35.1%; aminopyrine N-demethylase activities in liver were increased by up to 42.4%. **Conclusions:** The ethyl acetate extract of Semen Hoveniae capsule had no inhibition effect on the liver microsomal cytochrome P450, NADPH-Cyt C reductase and levels erythromycin N-demethylase in rats. However, aniline hydroxylase activities and aminopyrine N-demethylase activities were significantly affected.

[Key words] Semen Hoveniae; ethyl acetate extract; cytochrome P450

细胞色素 P450 (cytochrome P450, CYP) 酶系是药

物在体内进行生物转化的重要酶系统, 同时它也参与许多内源物质及外源物质(例如毒物和前致癌物质)的体内代谢。近年来, 天然药物对 P450 的影响也逐渐受到重视^[1], 如研究发现黄酮及其衍生物能够影响多种 P450 酶, 调节其代谢活性^[2]。

枳椇子系鼠李科枳椇属植物枳椇(*Hovenia dulcis*

[收稿日期] 2006-06-26

[基金项目] 湖北省科技攻关项目(202AA301C61)

[通讯作者] * 张洪, Tel: (027) 62358378; E-mail: zhzx8888@163.

com

Thunb.) 干燥成熟的种子。又名: 鸡距子, 拐枣等。始载于《唐本草》, 现为中华人民共和国卫生部标准所收载。其功效主要为清热利尿, 解酒毒。用于热病烦渴、呃逆、呕吐、小便不利、酒精中毒^[3]。枳椇子含有多种黄酮类化合物, 是其主要活性成分。本文观察了枳椇子乙酸乙酯提取物(主要成分为黄酮类化合物) 胶囊对大鼠肝微粒体中细胞色素 P450 的含量和活性的影响, 并进一步分析其对 P450 亚家族的选择性。

1 实验材料

1.1 药材、试剂 枳椇子药材购于武汉龙泰药业有限公司; 经鉴定, 系鼠李科植物枳椇(*Hovenia dulcis* Thunb.) 的干燥成熟种子。细胞色素 C, 异柠檬酸, 异柠檬酸脱氢酶, NADPH (β -Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reduced form), NADP (β -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate), 红霉素均为 Sigma 产品; 芦丁购于中国药品生物制品检定所; 牛血清蛋白(BSA), 4-氨基酚, 甲醛, 乙酰丙酮等为国产分析纯。

1.2 实验动物 健康 δ Wistar 大鼠, 28 只, 体重(220 \pm 25)g, 购于湖北省实验动物研究中心, 许可证号: SCXK(鄂)2003-0005。

1.3 实验仪器 Sigma 3K30 型冷冻离心机, UV-2800 紫外可见分光光度计(尤尼柯仪器有限公司), DY89-1 型电动玻璃匀浆机(宁波新芝生物科技股份有限公司), 恒温水浴锅(江苏金坛医疗仪器厂), 超声振荡仪(江苏金坛医疗仪器厂), RE52CS 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪四厂), Forma 702 型超低温冰箱, Siemens 低温冰箱。

2 实验方法

2.1 药物的制备 枳椇子药材 2.5 kg, 加入 8 倍量的 75% 的乙醇, 回流提取 3 次, 每次 1.5 h。合并提取液, 静置过夜, 过滤, 滤液浓缩至无醇味, 用石油醚萃取数次, 分取水层并浓缩为干浸膏, 用乙酸乙酯超声分散, 过滤, 弃去残渣, 滤液回收乙酸乙酯, 得枳椇子总黄酮提取物(平均得率 3.5%)。以芦丁为标准, 用紫外分光光度法测定总黄酮含量为 30.5%。枳椇子乙酸乙酯提取物加适量药用淀粉制成枳椇子乙酸乙酯提取物胶囊。实验时将胶囊内容物用 0.1% 羧甲基纤维素钠(CMC-Na) 溶液配制 5%、6% 和 7% 三个剂量浓度的混悬液, 即 1.4 g 生药/mL, 1.7 g 生药浓度和 2.0 g 生药/mL 3 个浓度。

2.2 给药方法 将 28 只大鼠随机分成 4 组, 分别为对照组和枳椇子乙酸乙酯提取物低、中、高 3 个剂量组。对照组以 10 mL/kg 体重给大鼠灌服 0.1% 羧甲基纤维素钠(CMC-Na) 溶液, 连续 10 d; 枳椇子乙酸乙酯提取物低、中、高 3 个剂量组给大鼠灌服相当于 14 g 生药/(kg·d)、17 g 生药/(kg·d)、20 g 生药/(kg·d) 提取物, 连续 10 d。

2.3 肝微粒体的制备 用药结束后, 动物禁食 12 h, 断头处死, 开腹后迅速用冷生理盐水经门静脉注射, 以清除器官内的残留血液, 摘除肝脏并用预冷的生理盐水清洗, 滤纸吸干水分, 剪碎肝组织并称量, 按 1:4 加入 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲溶液(1.15% KCl, pH7.4), 制成肝匀浆。4 $^{\circ}$ C, 200 \times g 离心 10 min, 取上清液 4 $^{\circ}$ C, 9 000 \times g 离心 20 min, 适量上清液与 88 mmol \cdot L⁻¹ CaCl₂ 混匀(利用钙离子与内质网碎片发生聚集, 低速分离出聚集的微粒体), 冰浴 5 min, 4 $^{\circ}$ C, 27 000 \times g 离心 15 min, 将沉淀板离心洗涤一次, 将所得的微粒体加适量 0.25 mol \cdot L⁻¹ 蔗糖溶液重悬, -80 $^{\circ}$ C 保存备用^[4]。

2.4 细胞色素 P450 测定 P450 酶的活性用 Omura 方法测定^[5]。

2.5 NADPH-细胞色素 C(P-450) 还原酶的测定 NADPH-细胞色素 C(P-450) 还原酶的活性依照文献[6]测定。

2.6 氨基比林 N-脱甲基酶(AMD) 和红霉素 N-脱甲基酶(ERD) 活性测定 氨基比林 N-脱甲基酶(AMD) 和红霉素 N-脱甲基酶(ERD) 活性测定用分光光度计法^[6]。红霉素和氨基比林的终浓度分别为 0.4 mmol \cdot L⁻¹ 和 8 mmol \cdot L⁻¹, 代谢产物-甲醛用 Nash 试剂定量。

2.7 苯胺羟化酶(ANH) 活性测定 苯胺羟化酶(ANH) 活性测定参考文献方法^[6]。

3 结果

3.1 枳椇子乙酸乙酯提取物对大鼠肝微粒体细胞色素 P450 及 NADPH-细胞色素 C(P-450) 还原酶活性的影响 如表 1 所示, 与空白对照组相比, 高、中、低剂量组的枳椇子乙酸乙酯提取物对大鼠的肝微粒体细胞色素 P450 及 NADPH-细胞色素 C(P-450) 还原酶的活性无显著影响。

3.2 枳椇子乙酸乙酯提取物对大鼠肝微粒体对氨基比林 N-脱甲基酶(AMD)、红霉素 N-脱甲基酶(ERD) 和苯胺羟化酶(ANH) 活性的影响 由表 2 可见, 枳椇子乙酸乙酯提取物对代表 CYP 不同亚型特

表 1 枳椇子乙酸乙酯提取物对大鼠肝微粒体细胞色素 P450 及 NADPH 细胞色素 C (P-450) 还原酶活性的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 (g/kg × 10 d)	P450 (nmol·mg ⁻¹ Pro)	NADPH-细胞色素 C (P-450) 还原酶 (nmol·mg ⁻¹ Pro)
空白对照组	—	0.544 ± 0.062	21.117 ± 2.340
低剂量组	14	0.464 ± 0.070	15.448 ± 4.237
中剂量组	17	0.512 ± 0.086	17.258 ± 4.224
高剂量组	20	0.508 ± 0.053	15.351 ± 5.319

表 2 枳椇子乙酸乙酯提取物对大鼠肝微粒体对氨基比林 N-脱甲基酶 (AMD)、红霉素 N-脱甲基酶 (ERD) 和苯胺羟化酶 (ANH) 活性的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 g/kg × 10 d	AMD (nmol·min ⁻¹ mg ⁻¹)	诱导率 (%)	ERD (nmol·min ⁻¹ mg ⁻¹)	ANH (nmol·min ⁻¹ mg ⁻¹)	抑制率 (%)
空白对照组	—	3.060 ± 0.413	—	2.813 ± 0.222	3.473 ± 0.343	—
低剂量组	14	2.569 ± 0.467	—	3.022 ± 0.485	3.941 ± 0.928	—
中剂量组	17	3.889 ± 0.591 ²⁾	27.1	3.332 ± 0.335	2.493 ± 0.249 ²⁾	28.2
高剂量组	20	4.357 ± 0.664 ²⁾	42.4	2.948 ± 0.290	2.379 ± 0.824 ²⁾	31.5

注:与空白对照组比¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ 。

分复杂,各种药物之间的相互作用普遍存在。P450 是肝微粒体中最重要的混合功能氧化酶,参与大量的外源性和内源性物质代谢;而 P450 本身又可被许多物质诱导或抑制,是造成药物间相互作用的最重要原因。从药物代谢酶 P450 的角度研究药物之间相互作用,了解药物对 P450 酶的诱导或抑制,有助于阐明中药作用机制及毒副作用发生机制,对临床合理用药具有指导作用。

在 P450 超家族中, CYP2 是最大、最复杂的家族,占肝 CYP 总量的 35%,代谢约 50% 的临床用药^[7]。ADM 主要反映 CYP2A、2B 和 2C 亚家族中能进行脱甲基化反应的同工酶活性,如 2A2、2B1、2B2、2C11 等^[7,8]。枳椇子乙酸乙酯提取物提高 ADM 活性,提示对 CYP2 家族有诱导作用。而 ANH 是 CYP 2E1 的标志酶, CYP2E1 不但参与部分药物的代谢,而且还能催化许多前致癌物和毒物的活化过程。人和动物的 CYP 2E1 活性十分近似,且底物都是相同的^[21]。实验结果提示,枳椇子乙酸乙酯提取物对 CYP2E1 呈显著抑制作用,则说明其可降低 CYP2E1 介导的前致癌物和毒物的活化。

同时,结果表明枳椇子乙酸乙酯提取物对细胞色素 CYP2E1 有明显的抑制作用,提示当枳椇子乙酸乙酯提取物胶囊与由细胞色素 CYP2E1 代谢的药物合用时,要适当减少剂量;而对细胞色素 CYP2A、2B 和 2C 有明显的诱导作用,提示当枳椇子乙酸乙

酯提取物胶囊与由细胞色素 CYP2A、2B 和 2C 代谢的药物合用时,要适当增加剂量从而达到满意的疗效并减少毒副作用。

4 讨论

在中药药效物质基础的现代研究中,药物之间的相互作用是一个重要的内容。因为中药复方成

征性底物代谢产生不同的影响,对氨基比林 (CYP 2A, 2B, 2C) 代谢表现明显的诱导作用,诱导率高达 42.4%,对苯胺 (CYP 2E1) 的代谢表现明显的抑制作用,最高抑制率达 31.5%,而对红霉素 (CYP3A) 代谢有一定的诱导作用,但与空白对照组相比没有显著差异。

[参考文献]

- [1] Scott GN, Elmer GW. Update on natural product—drug interaction[J]. Am J Health Syst Pharm, 2002, 59(4): 339-347.
- [2] Doostdar-H, Burke M D, Mayer R T. Bioflavonoids: Selective and Inhibitors for Cytochrome P450 CYP1A and CYP1B1 [J]. Toxicology, 2000, 144(1-3): 31.
- [3] 谢宗万,余友岑.全国中草药名鉴[M].上册.北京:人民卫生出版社,1996.554.
- [4] 徐叔云,卞如濂,陈修.药理实验方法学[M].第二版.北京:人民卫生出版社,1991.994,489.
- [5] Omura T, Sato R. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes [J]. J Biol Chem, 1964, 239(10): 2370-2378.
- [6] Peng R X, Wang Y S, Lei S B, et al. Characterization of Monooxygenase System in Chinese Fetal Adrenal Gland [J]. Asia Pacific J Pharmacol, 1994, 9(3): 195.
- [7] 肖洲生,王连生,朱冰,等. CYP2 [M]. 见:周宏灏主编.遗传药理学,北京:科学出版社,2001.84-95.
- [8] 冷欣夫.部分 P450 基因型和催化反应 [M]. 见:冷欣夫,邱星辉主编.细胞色素 P450 酶系的结构、功能与应用前景,北京:科学出版社,2001.56-57.