

# 甘草、芫花合用对大鼠肝脏细胞色素 P450 酶的影响

肖成荣, 王宇光, 代方国, 马增春, 谭洪玲, 高月\*  
(军事医学科学院放射与辐射医学研究所, 北京 100850)

[摘要] 目的: 为了阐明基于药物代谢酶的中药十八反产生相反作用的机制, 选择相反药对甘草、芫花作为研究对象, 研究二者合用对主要药物代谢酶 CYP1A2、CYP2E1、CYP3A1/2 酶活性的影响。方法: 采用高效液相色谱法测定 CYP1A2、CYP2E1 活性; 采用紫外-可见分光光度法测定 CYP3A1/2 活性。结果: 甘草、芫花合用后 CYP1A2、CYP2E1、CYP3A1/2 的酶活性增加, 与对照组比较有显著差异 ( $P < 0.05 \sim 0.001$ )。结论: 两药合用对药物代谢酶的影响可能会使某些药物毒性成分在体内代谢特征发生改变, 对药物的疗效或毒性产生影响, 从而产生基于药物代谢酶的中药间相互作用。

[关键词] 中药十八反; 细胞色素 P450; 酶活性

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2006)12-0048-03

## The Effect of *Aconitum* Coadministration with *Lilac Daphne* on Cytochrome P450 in Rat Liver

XIAO Cheng-rong, WANG Yu-guang, DAI Fang-guo, MA Zeng-chun, TAN Hong-ling, GAO Yue\*  
(Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Science, Beijing 100850, China)

[Abstract] **Objective:** To elucidate the incompatible mechanism of traditional Chinese Medicine, the effect of *Aconitum* coadministration with *Lilac Daphne* on the main enzyme activity, such as CYP1A2, CYP2E1 and CYP3A1/2. **Methods:** CYP1A2 and CYP2E1 activities were quantitated by high performance liquid chromatographic (HPLC) assay; CYP3A1/2 activity was quantitated by UV chromatography. **Results:** *Aconitum* coadministration with *Lilac Daphne* obviously promoted the activities of CYP1A2, CYP2E1 and CYP3A1/2 ( $P < 0.05 \sim 0.001$ ). **Conclusion:** The effect on the enzymes activity of CYP1A2, CYP2E1, CYP3A1/2 of *Aconitum* coadministration with *Lilac Daphne* may change the toxic component's metabolism and influence pharmaceutical effect and toxicity. The herb-herb interaction maybe occur.

[Key words] eighteen incompatible pairs; cytochrome P450; enzyme activity

细胞色素 P450 (CYP450) 属血红蛋白类酶, 是微粒体混合功能氧化酶系中最重要的一族氧化酶, 分布在多种器官、组织, 是由许多同工酶组成的基因超家族, 参与许多内源、外源性化合物在体内的 I 相生物转化, 它使进入机体的外源物经代谢后向两个方向发展: 代谢解毒和代谢活化, 代谢活化后的产物有较强的毒性, 甚至产生致畸、致癌效应<sup>[1]</sup>。CYP450 酶对维持机体内环境稳态有重要作用, 是药理学、毒

理学研究热点, 尤其对阐明药物间的相互作用和指导临床合理用药有着非同寻常的意义。在肝脏微粒体中, 参与内源性和外源性物质 (包括药物、环境污染物等) 代谢的细胞色素 P450 亚型主要有 CYP1A2、CYP2E1 和 CYP3A 等, 它们分别占 CYP 总量的 13%、7% 和 30%<sup>[2]</sup>。

甘草和芫花合用属于传统中医药理论“十八反”中的配伍禁忌, 但甘草、芫花合用产生相反作用的机制并不清楚。P450 作为药物代谢主要酶类, 在药物相互作用中扮演重要角色, 中药虽然成分复杂, 就其有效成分或单体在体内的代谢变化而言, 仍遵循一般药物代谢的基本规律。本文通过研究甘草、芫

[收稿日期] 2005-11-29

[通讯作者] \* 高月, Tel: (010) 66931312; E-mail: gaoyue@nic.bmi.ac.cn

花合用对大鼠细胞色素 P450 亚型酶活性的影响,为进一步探讨“十八反”的可能作用及机理提供实验依据。

## 1 材料与方法

**1.1 动物分组及给药** Wistar 大鼠,雄性,体重(200 ± 20) g,由军事医学科学院实验动物中心提供。药物按中国药典 I 部规定的临床剂量按体表面积换算成大鼠剂量,动物随机分为空白组、甘草组(0.75 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>)、芫花组(0.25 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>)、甘草、芫花合用组(1.00 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>),每组 6 只。空白组给予生理盐水,各药物组给予规定剂量药物,连续灌胃给药 7 d 后处死动物,取肝脏制备微粒体。

**1.2 药物制备** 甘草、芫花购自北京同仁堂药厂,经本所马百平教授鉴定分别为豆科植物甘草(*Glycyrrhiza uralensis* Fisch)的干燥根,瑞香科植物芫花(*Daphne genkwa* Sieb. et zucc)的干燥花蕾,二者分别产自内蒙古、安徽。甘草称重后加入去离子水,浸泡 60 min 后于烧瓶中加热回流 3 次,每次 1 h,合并提取液,滤纸过滤去除杂质,旋转蒸发浓缩至药液浓度为 0.06 g/mL;芫花提取液制备同上,药液浓度为 0.02 g/mL;甘草、芫花合用按中国药典 I 部规定的临床剂量比例称重混合,制备方法同上,药液浓度为 0.08 g/mL。

**1.3 药品与试剂** 对硝基酚(4-Nitrophenol, 4-NP)、非那西丁(Phenacetin),Sigma 公司;红霉素(Erythromycin) AMRESCO 公司;1,2-二羟基-4-硝基苯(4-Nitrocatechol, 4-NC) ACROS 公司,其他无机及有机试剂均为国产分析纯。

**1.4 肝微粒体的制备** 于给药 7 d 后禁食 12 h 以上断头处死动物,迅速打开腹腔,作肝门静脉插管,用预冷的生理盐水灌流至肝脏颜色变为土黄色为止。采用钙沉淀法制备微粒体<sup>[3]</sup>,肝脏组织按 1:4 (w/v) 比例加入 TMS 缓冲液匀浆后于 12 000 g, 4 °C,离心 20 min,弃沉淀,取上清液,每 1 mL 上清液加 0.1 mL 88 mmol/L CaCl<sub>2</sub> 溶液,轻搅拌数次,混匀,冰浴 5 min。再 27 000 g, 4 °C,离心 20 min,弃上清,取沉淀,按 1 g 肝重加 1 mL 0.1 mol/L Tris-HCl 缓冲液(含 150 mM KCl, pH7.4)。再 27 000 g,离心 20 min,4 °C,弃上清,取沉淀,按 1 g 肝重加 1 mL 0.01 mol/L Tris-HCl 缓冲液(含 1 mmol/L EDTA and 20% (w/v) 甘油, pH7.4) 用玻璃匀浆器重悬,重悬液放入液氮管中,液氮中保存备用。微粒体蛋白含量采用 Lowery

法定量,使用牛血清蛋白作为标准。实验中测定微粒体蛋白含量平均为 6.47 ± 1.35 mg/mL。

**1.5 CYP1A2、CYP2E1、CYP3A1/2 活性测定** 实验采用高效液相色谱法测定 CYP1A2、CYP2E1 活性<sup>[4,5]</sup>;采用紫外-可见分光光度法测定 CYP3A1/2 活性<sup>[6]</sup>。

**1.6 CYP450 及 b<sub>5</sub> 含量测定** 根据各样品的蛋白含量,用 pH7.4 的 Tris 缓冲液稀释微粒体蛋白悬液至 0.5 mg/mL,共 6 mL,分成 2 管。一管作为空白对照管,另一管加 10 μL 连二亚硫酸钠(0.1 g/mL)混匀,作为 b<sub>5</sub> 样品测定管,400 nm~ 500 nm 扫描测定样品 b<sub>5</sub> 含量;取出上述空白对照管倒入原管中,加 10 μL 连二亚硫酸钠 0.1 g/mL 混匀,充 CO 1 min,作为 P450 酶样品测定管,上述 b<sub>5</sub> 样品测定管作为空白对照管,400 nm~ 500 nm 扫描测定 CYP450 酶含量。

**1.7 统计学处理** 实验数据以平均值 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,两组间的差异显著性用 student *t* 检验。

## 2 结果

**2.1 甘草、芫花合用后对 CYP450 及 b<sub>5</sub> 含量的影响** 药后 7 d 甘草组 CYP450 含量与对照组比较呈增高趋势,芫花组 CYP450 含量呈降低趋势,甘草芫花合用组 CYP450 含量与芫花组比较呈增高趋势,但均无统计学差别;甘草组 b<sub>5</sub> 含量与对照组比较没有显著差别,芫花组 b<sub>5</sub> 含量显著高于对照组,甘草加芫花合用组 b<sub>5</sub> 含量显著低于芫花组,统计差别显著(*P* < 0.001),结果见表 1。

表 1 甘草、芫花合用对 CYP450、b<sub>5</sub> 含量的影响( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	剂量 (g/kg)	P450 (nmol/mg)	b <sub>5</sub> (nmol/mg)
对照组	—	0.34 ± 0.15	0.28 ± 0.03
甘草组	0.75	0.44 ± 0.08	0.26 ± 0.04
芫花组	0.25	0.27 ± 0.11	0.45 ± 0.05 <sup>1)</sup>
甘草、芫花合用组	1.00	0.38 ± 0.08	0.22 ± 0.11 <sup>2)</sup>

注:与对照组比较,1) *P* < 0.001;与芫花组比较,2) *P* < 0.001。

**2.2 甘草、芫花合用后对 CYP1A2、CYP2E1、CYP3A1/2 酶活性的影响** 由图 1 可见,甘草与空白组比较,能明显增加 CYP2E1 亚酶含量(*P* < 0.001),对 CYP2E1 酶活性具有诱导作用。芫花与空白对照组比较能够降低 CYP1A2 酶活性(*P* < 0.001),增加 CYP2E1 酶活性(*P* < 0.001);甘草、芫花合用后与芫花组比较,CYP3A1/2、CYP1A2(*P* < 0.05 或 *P* < 0.01) 酶活性升高,与对照组比较,合用组能够增加

CYP2E1 酶活性且具有统计学差异 ( $P < 0.05$ )。

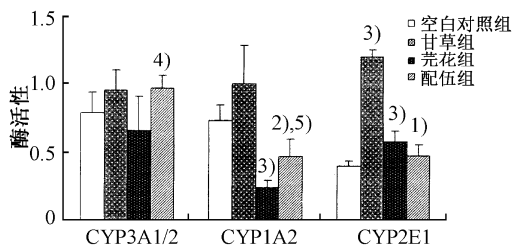


图 1 甘草、芫花合用后对 CYP1A2、CYP2E1、CYP3A1/2 酶活性的影响

注: 与对照组比较, 1)  $P < 0.05$ , 2)  $P < 0.01$ , 3)  $P < 0.001$ ; 与芫花组比较, 4)  $P < 0.05$ , 5)  $P < 0.01$ 。

### 3 讨论

中药配伍禁忌是古人在中医实践中的长期用药经验总结, 芫花与甘草配伍属其中的一个相反药对。有文献报道芫花配伍甘草后对大鼠心、肝、肾组织形态有一定影响, 甘草的用量大于芫花 2 倍时, 极易引起中毒, 同时芫花的轻度利尿作用可被甘草所拮抗, 表明甘草、芫花同用后可能存在着配伍禁忌<sup>[7,8]</sup>。本实验评价了甘草、芫花合用后对雄性大鼠肝细胞色素 P450 酶的影响, 旨在从药物代谢角度阐明相反的作用机制。结果显示两药合用后与单用芫花组比较, P450 含量增加, b<sub>5</sub> 含量显著降低, CYP1A2、CYP2E1、CYP3A1/2 酶活性均有所增加。P450 总蛋白和 b<sub>5</sub> 蛋白是药物代谢途径中的重要电子传递系统, 对药物代谢有重要作用。结果显示甘草可明显使 P450 酶含量增加, 芫花使 P450 酶含量降低, 二者合用后酶活性恢复至正常水平, 表明甘草、芫花对 P450 酶起相互拮抗作用, 可能为相反作用在药物代谢酶上具体表现。甘草可明显增加 CYP1A2、CYP2E1 及 CYP3A1/2 的酶活性, 说明甘草作为 P450 酶的诱导剂, 可能与其解毒作用有关。芫花与甘草配伍后与芫花组比较, 三种亚酶的活性均有不同程度升高, 一方面说明甘草与芫花配伍应用时, 以甘草对药酶的诱导作用占主导, 抵消了芫花对几种亚酶活性的抑制作用, 显示甘草的解毒潜力; 另一方面从药物“相反”作用角度考虑, 这种配伍后的对酶活性诱导效应可能会加速芫花中有效成分的代谢, 而使功效降低, 或使毒性成分代谢活化而至毒性, 这些都是相反作用的体现, 但仍需进一步实验证据支持。

改变药物生物转化反应最常见的两种原因是 CYP 酶的诱导和抑制, 酶的诱导可增加生物转化率,

从而降低药物的浓度, 通常表现为药物的作用降低, 若代谢形成活性药物则可增加药物的毒性; 而酶的抑制可增加药物的浓度, 延长药理作用时间, 药物引起的毒性反应的发生率也会增加<sup>[9]</sup>。芫花被中华人民共和国药典列为有毒中药, 因此合用对药物代谢酶的影响可能会使芫花中的某些毒性成分在体内代谢特征发生改变, 对药物的疗效或毒性产生影响, 从而导致药物相互作用, 这些有待于进一步研究确证。本实验为甘草与芫花配伍对药物代谢酶影响提供了相关数据有助于研究的深入。

### [参考文献]

- [1] 夏伟. 细胞色素 P450 的研究进展[J]. 国外医学卫生学分册, 2000, 27(1): 41-43.
- [2] Shimada T, Yamazaki H, Mimura M, et al. Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians[J]. J Pharmacol Exp Ther, 1994, 270: 414-423.
- [3] 刘耕陶. 药理实验方法学[M]. 第二版, 北京: 人民卫生出版社, 1994. 489.
- [4] Kokwaro GO, Glazier AP, Ward SA, et al. Effect of malaria infection and endotoxin induced fever on phenacetin O-deethylation by rat liver microsomes[J]. Biochem Pharmacol, 1993, 45(6): 1235-1241.
- [5] Tassaneeyakul W, Veronese ME, Birkett DJ, et al. High performance liquid chromatographic assay for 4-nitrophenol hydroxylation, a putative cytochrome P-4502E1 activity, in human liver microsomes[J]. J Chromatogr, 1993, 616(1): 73-78.
- [6] Bray BJ, Rosengren RJ. Retinol potentiates acetaminophen induced hepatotoxicity in the mouse: Mechanistic studies[J]. Toxicol Appl Pharmacol. 2001. 173: 129-136.
- [7] 黄文权, 程相岭, 肖鸿, 等. 甘草配伍芫花对大鼠心肝肾功能及组织形态的影响[J]. 中国中医急症, 2003, 12(2): 155-156.
- [8] 黄文权, 程相岭, 肖鸿, 等. 中药十八反中部分禁忌中药的毒理实验研究[J]. 成都中医药大学学报, 2001, 24(1): 45-47.
- [9] 刘萍, 边强. 细胞色素 P450 酶系对药物生物转化的作用[J]. 国外医药合成药生化药制剂分册, 2000, 21(5): 305-308.