

# 18 $\alpha$ -甘草酸下调“胶原蛋白凝胶三明治”培养的大鼠肝细胞 P450 酶活性及 mRNA 表达

杨 静<sup>1\*</sup>, 彭仁琇<sup>1</sup>, 于皆平<sup>2</sup>

(武汉大学医学院 1. 药理学教研室, 2. 附属第一医院消化内科, 湖北 武汉 430071)

**摘要** 研究 18  $\alpha$ -甘草酸(18  $\alpha$ -GA)对肝细胞主要细胞色素 P450(CYP)药物代谢酶的影响,并初步探讨其分子机理。采用“胶原蛋白凝胶三明治”培养的原代大鼠肝细胞,加 18  $\alpha$ -GA 孵育,酶学测定 CYP1A1(7-乙氧基异噁唑 O-脱乙基酶,EROD), CYP2E1(苯胺羟化酶,ANH)和 CYP3A(红霉素 N-脱甲基酶,ERD)活性,逆转录聚合酶链反应测定 CYP1A1, CYP2E1 和 CYP3A1 mRNA 表达水平。结果可见,18  $\alpha$ -GA 浓度依赖性(50 ~ 400 mg·L<sup>-1</sup>)抑制大鼠肝细胞 EROD, ANH 和 ERD 活性,200 mg·L<sup>-1</sup>作用最强,抑制率分别可达 59.6%、69.7% 和 44.7%,且呈时间依赖性,于 d 4 达高峰;浓度依赖性(50 ~ 200 mg·L<sup>-1</sup>)抑制 CYP1A1, CYP2E1 和 CYP3A1 mRNA 表达水平,分别可达 44.5%、58.1% 和 37.0%。上述结果表明 18  $\alpha$ -GA 在转录水平下调大鼠肝细胞 CYP1A1, CYP2E1 和 CYP3A1 表达。

**关键词** 18  $\alpha$ -甘草酸;细胞,培养的;胶原蛋白凝胶三明治;细胞色素 P450;逆转录聚合酶链反应

中图分类号:R963

文献标识码:A

文章编号:1000-300X(2001)02-0155-04

18  $\alpha$ -甘草酸(18  $\alpha$ -glycyrrhizic acid, 18  $\alpha$ -GA)是从天然甘草中差向异构筛选而得的有效单体,具有治疗肝损伤和预防癌症等作用<sup>[1~3]</sup>。以前,作者在整体水平研究了它对大鼠肝药酶的影响(内部资料),但体外研究及其作用的分子机理未见报道。本

文研究了 18  $\alpha$ -GA 对原代培养大鼠肝细胞主要与药物代谢相关的 CYP 酶活性及 mRNA 表达的影响,为深入探讨其作用机理或可能产生的药物相互作用提供实验依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 药品与试剂

18  $\alpha$ -GA 批号 9911071,由连云港正大天晴制药有限公司提供。7-乙氧基异噁唑(7-ethoxyresorufin), 9-羟基-3-异吩噁唑酮(9-hydroxy-3-isophenoxazone),红霉素(erythromycin),苯胺(aniline),EGTA[ethylene glycol-bis( $\beta$ -aminoethyl ether)N,N,N',N'-tetraacetic acid]和 IV 型胶原酶均为 Sigma 公司产品。胶原蛋白 I 型为 Boehringer Mannheim 公司产品。新生牛血清,DMEM 培养基,Trizol 试剂盒和逆转录聚合酶链反应(reverse transcript-polymerase chain reaction, RT-PCR)试剂盒为 Gibco 公司产品。CYP1A1, CYP2E1, CYP3A1 及内对照亲环素(cyclophilin, CYC)引物由 Gibco 公司合成。

### 1.2 肝细胞分离和培养

采用两步循环灌注法<sup>[4]</sup>和“胶原蛋白凝胶三明治”培养<sup>[5]</sup>稍加改动。 $\uparrow$  Wistar 大鼠(体重 200 ~ 250 g),戊巴比妥钠麻醉,开腹,门静脉插管,以预温 37℃,含 0.5 mmol·L<sup>-1</sup> EGTA 的无钙灌流液灌流至肝组织呈黄色,换 0.05% IV 型胶原酶灌流。取下软化的肝组织,剪碎包膜,将肝细胞分散于清洗液中,用 100 目的尼龙网滤过,洗涤(50  $\times$  g, 1 min)3 次,台盼蓝染色,鉴定细胞活率在 85% 以上。肝细胞接种在预先包被有 I 型胶原的培养板上,细胞贴壁后弃去培养基,在其表面添加一层胶原蛋白,5% CO<sub>2</sub>, 37℃ 温孵约 3 h,待第二层胶原蛋白凝胶形成后再加培养基继续培养。培养基为 DMEM 中补充 10% 新生牛血清,1% 二甲亚砜,地塞米松(1  $\mu$ mol·L<sup>-1</sup>),胰岛素(160 U·L<sup>-1</sup>)和胰高血糖素(0.014 mg·L<sup>-1</sup>)。

收稿日期 2000-11-02 接受日期 2001-01-20

**作者简介** 杨 静(1964-),男,湖北省武汉市人,博士,主治医师,主要从事内科临床和生物化学药理研究;彭仁琇(1935-),女,上海市人,教授,主要从事生物化学药理和药物代谢研究。

\* 联系作者。Tel: (027) 87331565, Fax: (027) 86815492,

E-mail: yangjingliu@yahoo.com.cn

### 1.3 药物作用

在上述培养基中分别加入不同浓度的 18  $\alpha$ -GA 为实验组,添加等容积的生理盐水为对照组,培养 4 d,收集肝细胞进行酶学分析和半定量 RT-PCR,观察浓度效应;在上述实验结果的基础上,选择最大抑制浓度的 18  $\alpha$ -GA 添加到培养基中,分别培养 1, 2, 4, 6 和 8 d,收集肝细胞进行酶学分析,观察时间效应。

### 1.4 酶学分析

肝细胞超声波破碎制备匀浆,钙沉淀法制备微粒体<sup>[6]</sup>。CYP1A1(7-乙氧基异噁唑 O-脱乙基酶,7-ethoxyresorufin O-deethylase, EROD)活性按荧光法<sup>[7]</sup>测定,7-乙氧基异噁唑终浓度为 2  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ;CYP2E1(苯胺羟化酶,aniline hydroxylase, ANH)活性测定参照文献<sup>[8]</sup>,苯胺终浓度 16  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ;CYP3A(红霉素 N-脱甲基酶,erythromycin N-demethylase, ERD)活性测定用分光光度法<sup>[9]</sup>,红霉素终浓度为 8  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,以牛血清白蛋白为标准,按 Lowry 法<sup>[10]</sup>测蛋白质含量。

### 1.5 RT-PCR 测定 mRNA 表达水平

细胞总 RNA 按 Trizol 一步法制备。电泳分析表明 18S 和 28S 条带清晰可见,总 RNA 片段完整未降解。CYP1A1, CYP2E1, CYP3A1 及内对照(CYC)引物设计和 RT-PCR 反应建立参照文献<sup>[11]</sup>,稍加改动。RT-PCR 产物经 3% 的琼脂糖凝胶电泳分离并与 DNA 分子量标准(PBR322/MSP1)比较鉴定。用 UVP 公司透射扫描仪进行电泳条带峰体积定量测定。以 CYC 基因 RT-PCR 产物为内对照,计算 CYP1A1, CYP2E1 或 CYP3A1 基因与 CYC 基因扩增条带峰体积的比值作为 mRNA 表达的相对水平。

### 1.6 统计学处理

结果以  $\bar{x} \pm s$  表示。用方差分析进行多组数据

间比较,再用  $q$  检验进行两两比较。

## 2 结果

### 2.1 对肝细胞 CYP1A1, CYP2E1 和 CYP3A 活性的影响

#### 2.1.1 浓度效应

表 1 结果可见,18  $\alpha$ -GA 对 EROD(CYP1A1), ANH(CYP2E1) 和 ERD(CYP3A) 活性呈浓度依赖性抑制。其中,在 50~200  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  范围内,随给药浓度增加,对 CYP1A1, CYP2E1 和 CYP3A 活性的抑制逐渐增强,至 200  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  达高峰,最大抑制率分别为 59.6%、69.7% 和 44.7%,至 400  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  对 CYP2E1 抑制依然维持在较高水平,但对 CYP1A1 和 CYP3A 抑制反而有所下降。

#### 2.1.2 时间效应

“胶原蛋白凝胶三明治”培养体系能相对较好地维持 CYP1A1, CYP2E1 和 CYP3A 的活性,但 CYP 酶活性在体外仍逐渐下降,故设置不同培养时间的平行对照以观察 200  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  的 18  $\alpha$ -GA 作用 1~8 d 的时效关系。表 2 结果可见:培养 1~4 d,18  $\alpha$ -GA 对 CYP1A1, 2E1 和 3A 活性的抑制作用逐渐增强,d 4 达高峰,抑制率分别为 55.1%、65.6% 和 39.6%,d 6 抑制率还维持在较高水平。结果显示 18  $\alpha$ -GA 抑制 CYP1A1, 2E1 和 3A 活性,且呈时间依赖性。

### 2.2 对肝细胞 CYP1A1, CYP2E1 和 CYP3A1 mRNA 表达的影响

由表 3 结果可见,当 50, 100, 200  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  的 18  $\alpha$ -GA 作用 4 d,随药物浓度的增加,CYP1A1/CYC, CYP2E1/CYC 和 CYP3A1/CYC 逐渐下降,至 200  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  抑制率达高峰,分别为 44.5%、58.1% 和

Tab 1. Effects of 18  $\alpha$ -glycyrrhizic acid(18  $\alpha$ -GA) treatment on cytochrome P450 isoenzyme activities in rat hepatocytes in sandwich culture

18 $\alpha$ -GA / $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	EROD		ANH		ERD	
	$\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$	% <sup>△</sup>	$\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$	% <sup>△</sup>	$\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$	% <sup>△</sup>
0	19.3 $\pm$ 5.2	—	33.4 $\pm$ 8.1	—	0.38 $\pm$ 0.07	—
50	16.5 $\pm$ 3.1	14.5	25.1 $\pm$ 9.1	24.2	0.32 $\pm$ 0.07	15.8
100	10.4 $\pm$ 2.7*	46.1	18.1 $\pm$ 5.2*	45.5	0.25 $\pm$ 0.05*	34.2
200	7.8 $\pm$ 2.5**	59.6	10.2 $\pm$ 6.4**	69.7	0.21 $\pm$ 0.04**	44.7
400	8.5 $\pm$ 2.6**	56.0	10.2 $\pm$ 7.3**	69.7	0.23 $\pm$ 0.05*	39.5

EROD: 7-ethoxyresorufin O-deethylase(CYP1A1); ANH: aniline hydroxylase(CYP2E1); ERD: erythromycin N-demethylase(CYP3A). Primary culture of rat hepatocytes was treated with the indicated concentration of 18  $\alpha$ -GA for 4 d, then EROD, ANH and ERD activities were determined. <sup>△</sup>Data are given in percent of inhibition vs 0  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ .  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 4$ . \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , compared with 0  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ .

**Tab 2. Effects of 18  $\alpha$ -glycyrrhizic acid on time-courses of cytochrome P450 isoenzyme activities in rat hepatocytes in sandwich culture**

Time /d	EROD/nmol·min <sup>-1</sup> ·g <sup>-1</sup>		ANH/nmol·min <sup>-1</sup> ·g <sup>-1</sup>		ERD/ $\mu$ mol·min <sup>-1</sup> ·g <sup>-1</sup>	
	Control	18 $\alpha$ -GA	Control	18 $\alpha$ -GA	Control	18 $\alpha$ -GA
1	22.3 $\pm$ 4.5	20.7 $\pm$ 3.2 (7.3)	38.4 $\pm$ 7.6	34.5 $\pm$ 9.5 (10.5)	0.39 $\pm$ 0.09	0.36 $\pm$ 0.10 (7.7)
2	19.8 $\pm$ 3.1	14.2 $\pm$ 2.0* (28.3)	45.9 $\pm$ 5.1	29.8 $\pm$ 7.2** (35.6)	0.17 $\pm$ 0.05	0.12 $\pm$ 0.04 (29.4)
4	18.5 $\pm$ 3.3	8.3 $\pm$ 1.5** (55.1)	32.6 $\pm$ 4.1	11.2 $\pm$ 4.0** (65.6)	0.43 $\pm$ 0.06	0.26 $\pm$ 0.07** (39.6)
6	3.1 $\pm$ 1.0	1.5 $\pm$ 0.5* (51.6)	11.6 $\pm$ 3.1	4.5 $\pm$ 2.9** (63.6)	0.31 $\pm$ 0.04	0.14 $\pm$ 0.05** (38.7)
8	1.1 $\pm$ 0.8	0.6 $\pm$ 0.7 (45.5)	9.4 $\pm$ 2.9	5.5 $\pm$ 2.0 (44.4)	0.20 $\pm$ 0.05	0.14 $\pm$ 0.03 (30.0)

Primary rat hepatocytes with 18  $\alpha$ -GA (200 mg·L<sup>-1</sup>) were cultured for 1–8 d, CYP1A1, CYP2E1 and CYP3A activities were determined. Data in parentheses are given in percent of the inhibition vs their respective controls.  $\bar{x} \pm s$ , n = 4. \* P < 0.05, \*\* P < 0.01, compared with their respective controls.

37.0%. 统计学显示,当 18  $\alpha$ -GA 浓度  $\geq$  50 mg·L<sup>-1</sup>, 即可非常显著抑制 CYP1A1, CYP2E1 和 CYP3A1 mRNA 表达. 结果提示 18  $\alpha$ -GA 呈浓度依赖性抑制 CYP1A1, CYP2E1 和 CYP3A1 mRNA 表达.

**Tab 3. Effects of 18  $\alpha$ -glycyrrhizic acid on mRNA expression of cytochrome P450 1A1, 2E1 and 3A1 in rat hepatocyte in sandwich culture**

18 $\alpha$ -GA /mg·L <sup>-1</sup>	10 <sup>2</sup> × Relative level of mRNA expression		
	CYP1A1/CYC	CYP2E1/CYC	CYP3A1/CYC
0	1.28 $\pm$ 0.10	2.79 $\pm$ 0.31	43.3 $\pm$ 3.7
50	1.04 $\pm$ 0.07* (18.8)	2.06 $\pm$ 0.20** (26.2)	36.2 $\pm$ 2.1** (16.4)
100	0.85 $\pm$ 0.06** (33.6)	1.75 $\pm$ 0.16** (37.3)	32.1 $\pm$ 1.7** (25.9)
200	0.71 $\pm$ 0.09** (44.5)	1.17 $\pm$ 0.20** (58.1)	27.3 $\pm$ 1.0** (37.0)

The treatment for primary cultures of rat hepatocytes was the same as described in Tab 1. The cDNA products of CYP1A1, CYP2E1, CYP3A1 and housekeeping gene (cyclophilin, CYC) were quantified by using gel documentation analysis system. Data in parentheses are given in percent of inhibition vs 0 mg·L<sup>-1</sup>.  $\bar{x} \pm s$ , n = 4. \* P < 0.05, \*\* P < 0.01, compared with 0 mg·L<sup>-1</sup>.

### 3 讨论

肝细胞 CYP 酶对体外培养条件极其敏感,一般条件下活性很快丧失.“胶原蛋白凝胶三明治”培养体系能维持 CYP1A1, CYP2E1 和 CYP3A 的活性,是评价细胞色素 P450 酶诱导与抑制的理想体外模型<sup>[5]</sup>. 本文结果表明,18  $\alpha$ -GA 抑制“胶原蛋白凝胶三明治”培养的大鼠肝细胞 CYP1A1, CYP2E1 和 CYP3A 活性,这与作者以前整体水平研究的结论一致(内部资料). 同时,还观察到 18  $\alpha$ -GA 浓度依赖性抑制 CYP1A1, CYP2E1 和 CYP3A1 mRNA 表达,进一步说明 18  $\alpha$ -GA 是在转录水平发挥作用的,但其通过何种信号传导途径尚须进一步研究.

已知 CYP1A1 和 CYP2E1 在多种前致癌物或前毒物的代谢活化中起重要的催化作用. CYP1A1 水平是化学致癌作用的有效指征<sup>[12]</sup>. 18  $\alpha$ -GA 下调 CYP2E1 和 CYP1A1 表达水平,将有利于机体防御一些化学异物的损伤. 18  $\alpha$ -GA 抑制 CYP2E1 从而减少肝毒物(醋氨酚, CCl<sub>4</sub> 等)活化可能是其抗肝损伤作用的机理之一. 18  $\alpha$ -GA 抑制 CYP1A1 和 CYP2E1 能减少前致癌物的活化从而具有化学性预防肝癌的作用. CYP3A 是参与临床上大多数药物的代谢的 CYP 亚型. 18  $\alpha$ -GA 对 CYP3A 的作用,提示在临床上与经 CYP3A 代谢的药物合用时,尤其长期大剂量使用

时有可能产生药物相互作用。生药甘草是临床上常用的中草药,也是中药组方中的常用成分,研究其有效成分对肝药物代谢酶系统的影响有利于阐明药物作用机理和预测药物相互作用产生的可能性。

4 参考文献:

[1] 吴锡铭,吕坚,李冰如,李本根,茹仁萍. 甘草酸差向异构体对大鼠肝损害的治疗作用[J]. 中国药理学报, 1992, 13(4): 370-374.

[2] Shiota G, Harada K, Ishida M, Tomie Y, Okubo M, Katayama S, et al. Inhibition of hepatocellular carcinoma by glycyrrhizin in diethylnitrosamine-treated mice[J]. *Carcinogenesis*, 1999, 20(1): 59-63.

[3] 胡志厚. 甘草酸类药物的研制及应用[J]. 药学学报, 1988, 23(7): 553-560.

[4] Seglen PO. Preparation of isolated rat liver cells[J]. *Methods Cell Biol*, 1976, 13(1): 29-83.

[5] Kern A, Bader A, Pichlmayr R, Sewing KF. Drug metabolism in hepatocyte sandwich cultures of rats and humans[J]. *Biochem Pharmacol*, 1997, 54(7): 761-772.

[6] 刘耕陶. 酶学实验方法[A]. 见: 徐叔云, 卞如濂,

陈修, 主编. 药理实验方法学[M]. 第2版. 北京: 人民卫生出版社, 1991. 489.

[7] Burke MD, Prough RA, Mayer RT. Characteristics of a microsomal cytochrome P-448-mediated reaction. Ethoxyresorufin O-de-ethylation[J]. *Drug Metab Dispos*, 1977, 5(1): 1-8.

[8] Peng RX, Lei SB, Gao P. The capacity of drug metabolism in Chinese fetal livers. II. Metabolism of ethylmorphine, aminopyrine and aniline[J]. *Asian Pac J Pharmacol*, 1990, 5(1): 13-18.

[9] Peng RX, Wang YS, Lei SB, Fu LS, Chen JH, Li QX, et al. Characterization of monooxygenase system in Chinese fetal adrenal gland[J]. *Asian Pac J Pharmacol*, 1994, 9: 195-200.

[10] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent[J]. *J Biol Chem*, 1951, 193(1): 265-275.

[11] Morris DL, Davila JC. Analysis of rat cytochrome P450 isoenzyme expression using semi-quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction(RT-PCR)[J]. *Biochem Pharmacol*, 1996, 52(5): 781-792.

[12] Beresford AP. CYP1A1: friend or foe?[J] *Drug Metab Rev*, 1993, 25(4): 503-517.

## 18 α-Glycyrrhizic acid down-regulated the activities and mRNA expression of cytochrome P450 isoenzymes in rat hepatocyte sandwich cultures

YANG Jing<sup>1</sup>, PENG Ren-Xiu<sup>1</sup>, YU Jie-Ping<sup>2</sup>

(1. Department of Pharmacology, 2. Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital, Wuhan University School of Medicine, Wuhan 430071, China)

**Abstract:** To study the effect and mechanisms of 18 α-glycyrrhizic acid (18 α-GA) on cytochrome P450 (CYP) enzymes, the expression of CYP1A1, CYP2E1 and CYP3A was determined in rat hepatocyte sandwich cultures by using enzyme assay and semi-quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR). The results showed that the activities of CYP1A1 (7-ethoxyresorufin O-deethylase, EROD), CYP2E1 (aniline hydroxylase, ANH) and CYP3A (erythromycin N-demethylase, ERD) were decreased in concentration-dependent manner after treatment with 18 α-GA (50-400 mg·L<sup>-1</sup>), and at the concentration of 200 mg·L<sup>-1</sup> inhibitory rate reached the maxi-

um (the maximum inhibitory rate was 59.6%, 69.7% and 44.7%, respectively). The time course revealed that the inhibition reached plateau level at d 4 of culture. 18 α-GA decreased CYP1A1, CYP2E1 and CYP3A1 mRNA expression in dose-dependent manner, the maximum inhibitory rate was 44.5%, 58.1% and 37.1%, respectively. The results suggest that 18 α-GA down-regulate CYP expression at the transcriptive levels.

**Key words:** 18 α-glycyrrhizic acid; cells, cultured; collagen gel sandwich; cytochrome P450; reverse transcriptase-polymerase chain reaction