

18 α -甘草酸二铵对大鼠肝脏细胞色素 P450 和 II 相酶的影响杨 静^{1*}, 彭仁琇¹, 孔 锐¹, 于皆平²

(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: 目的 研究 18 α -甘草酸二铵(18 α -GL)对肝脏药物代谢酶的影响。方法 δ Wistar 大鼠 ig 18 α -GL 12.5 和 50 mg \cdot kg⁻¹, 分别给药 3, 6 和 12 d, 对照组给等容量的溶媒。酶学测定肝微粒体细胞色素 P450 (CYP), 尿苷二磷酸葡萄糖醛酸转移酶(GT)和谷胱甘肽巯基转移酶(GST)活性。结果 18 α -GL 抑制苯胺羟化酶, 乙氧异噁唑脱乙基酶和红霉素脱甲基酶活性, 抑制率分别可达 53.2%, 47.3% 和 34.3%; 增加 GT₁(底物为 7-甲基-4-羟基-香豆素), GT₂(底物为 4-羟基联苯)和 GST 活性, 分别可达 29.9%, 70.3% 和 48.3%。结论 18 α -GL 对大鼠肝微粒体 I 相酶(CYP2E1, CYP1A1 和 CYP3A)主要是抑制作用, 对 II 相酶(GT₁, GT₂ 和 GST)是诱导。

关键词: 18 α -甘草酸二铵; 细胞色素 P450; II 相酶

中图分类号: R963; R349.31

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870(2001)05-0321-04

现代研究表明, 甘草及其成分甘草酸有治疗肝损伤和预防癌症等作用^[1, 2], 对肝脏药物代谢酶也有明显影响^[3]。18 α -甘草酸二铵(18 α -glycyrrhizic acid, 18 α -GL)是从天然甘草中差向异构筛选而得的有效单体, 已广为临床使用, 但对肝脏药物代谢酶有无影响未见报道。为深入探讨其药理作用机制及可能产生的药物相互作用, 本文研究了 18 α -GL 对与药物代谢相关的主要肝细胞色素 P450 酶亚型和 II 相酶的影响。

材 料 与 方 法

药品与试剂 18 α -甘草酸二铵(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), 异噁唑(resorufin), 红霉素(erythromycin), 苯胺(aniline), 氨基比林(aminopyrine), 异柠檬酸(isocitric acid), 异柠檬酸脱氢酶(isocitric acid dehydrogenase), 1-氯-2, 4-二硝基苯(1-chloro-2, 4-dinitrobenzene, CDNB), 还原型谷胱甘肽(GSH), UDP-葡萄糖醛酸(uridine 5-diphosphoglucuronic acid, UDPGA), 7-羟基-4-甲基香豆素(7-hydroxy-4-methylcoumarin), 4-羟基联苯(4-phenylphenol)均为 Sigma 公司产品。Triton X-

100 为 Bio-Rad 公司产品。牛血清白蛋白(BSA), 氧化型辅酶 II(NADP), 4-氨基酚(4-aminophenol), 甲醛, 乙酰丙酮, 奎宁等为国产分析纯。

动物及处理 体重(300 \pm 20) g δ Wistar 大鼠, 由湖北省医学科学院实验动物中心提供。随机分组。18 α -GL(ip, qd) 12.5 mg \cdot kg⁻¹ 和 50 mg \cdot kg⁻¹ 组, 给药 3, 6 和 12 d。对照组给等容量的溶媒。末次给药后 24 h 处死动物, 取肝脏制备组织匀浆, 4 $^{\circ}$ C, 200 \times g 离心 10 min, 取上清液 9 000 \times g 离心 20 min, 适量上清液与 88 mmol \cdot L⁻¹ CaCl₂ 混匀, 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, 液氮管分装, -30 $^{\circ}$ C 保存备用。

酶学分析 肝微粒体细胞色素 P450 含量测定参照文献^[4]。7-乙氧基异噁唑 O-脱乙基酶(EROD)活性据荧光法^[5]以异噁唑为标准品在岛津 RF-540 荧光分光光度计上测定。激发波长 530 nm, 发射波长 586 nm。7-乙氧基异噁唑终浓度为 2 μ mol \cdot L⁻¹, 反应时间 10 min。氨基比林 N-脱甲基酶活性(AMN)和红霉素 N-脱甲基酶活性(ERD)测定用分光光度法^[6]。氨基比林和红霉素终浓度分别为 0.4 mmol \cdot L⁻¹, 8 mmol \cdot L⁻¹。代谢产物-甲醛用 Nash 试剂定量。苯胺羟化酶(ANH)测定参照文献^[7]。苯胺终浓度为 16 mmol \cdot L⁻¹, 反应时间 30 min, 谷胱甘肽 S 转移酶(GST)活性参照文献^[8]以 CDNB 为底物在岛津 UV-3000 双光束双波长分光光度计上测定。荧光法^[9]测定尿苷二磷酸葡萄糖醛酸转移酶(GT)

收稿日期: 2000-07-17.

作者简介: 杨 静, 男, 博士生, 主治医师.

* Tel: (027) 87331565, Fax: (027) 86815492,

E-mail: yangjingliu@yahoo.com.cn

活性。7-羟基-4-甲基香豆素(GT₁底物)和p-羟基联苯(GT₂底物)终浓度均为0.5 mmol·L⁻¹。反应时间10 min。于激发波长315 nm,发射波长365 nm测定GT₁活性。在激发波长290 nm,发射波长325 nm测定GT₂活性。以硫酸奎宁为相对标准计算酶活性。以牛血清白蛋白为标准,按Lowry法测定蛋白含量^[10]。

统计 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。

结 果

1 对大鼠肝脏细胞色素 P450 酶的影响

Tab 1 Effects of 18α-glycyrrhizic acid (18α-GL) given ip on rat liver cytochrome P450 isoenzyme activities

Dose/ mg·kg ⁻¹	Time/ d	P450/			EROD/			ANH/			ERD/			AMN/		
		μmol·min ⁻¹ ·mg ⁻¹	pmol·min ⁻¹ ·mg ⁻¹	% [#]	nmol·min ⁻¹ ·mg ⁻¹	% [#]	nmol·min ⁻¹ ·mg ⁻¹	% [#]	nmol·min ⁻¹ ·mg ⁻¹	% [#]	nmol·min ⁻¹ ·mg ⁻¹	% [#]	nmol·min ⁻¹ ·mg ⁻¹	% [#]		
0	3	0.50±0.09	47±14	-	0.053±0.008	-	0.70±0.12	-	0.64±0.15	-	0.64±0.15	-	0.64±0.15	-		
	6	0.49±0.10	42±14	-	0.056±0.009	-	0.69±0.11	-	0.57±0.10	-	0.57±0.10	-	0.57±0.10	-		
	12	0.47±0.17	48±18	-	0.050±0.009	-	0.64±0.12	-	0.60±0.13	-	0.60±0.13	-	0.60±0.13	-		
12.5	3	0.54±0.10	43±14	8.4	0.049±0.016	7.5	0.66±0.15	5.7	0.62±0.10	5.7	0.62±0.10	5.7	0.62±0.10	5.7		
	6	0.50±0.08	38±14	11.3	0.047±0.011	8.1	0.53±0.05 [*]	23.1	0.57±0.11	23.1	0.57±0.11	23.1	0.57±0.11	23.1		
	12	0.44±0.10	40±13	16.5	0.028±0.009 ^{**△}	44.0	0.54±0.16	15.6	0.55±0.11	15.6	0.55±0.11	15.6	0.55±0.11	15.6		
50.0	3	0.44±0.11	38±14	17.6	0.033±0.016 [*]	30.0	0.62±0.18	11.4	0.52±0.11	11.4	0.52±0.11	11.4	0.52±0.11	11.4		
	6	0.41±0.13	26±10 ^{*△}	38.3	0.026±0.012 ^{**}	53.2	0.52±0.08 [*]	24.6	0.64±0.08	24.6	0.64±0.08	24.6	0.64±0.08	24.6		
	12	0.45±0.20	26±13 ^{*△}	47.3	0.026±0.010 ^{**}	48.0	0.42±0.13 ^{**△△}	34.3	0.62±0.23	34.3	0.62±0.23	34.3	0.62±0.23	34.3		

Male Wistar rats were given daily doses of 18α-GL (12.5 or 50.0 mg·kg⁻¹ b. w. ip) for 3, 6 or 12 consecutive days. Liver microsomes were prepared, and the activities of aniline hydroxylase (ANH), 7-ethoxyresorufin O-deethylase (EROD) and erythromycin N-demethylase (ERD) were assayed

n = 6, $\bar{x} \pm s$. * P < 0.05, ** P < 0.01 vs their corresponding controls, [△] P < 0.05, ^{△△} P < 0.01 vs 18α-GL ip for 3 days group.

[#] The percent of inhibition vs controls

由表1可见,18α-GL两个剂量组和不同的给药天数对分别代表CYP不同亚型特征性底物如7-乙氧异噻唑(CYP1A1)、苯胺(CYP2E1)和红霉素(CYP3A)的代谢表现不同程度的抑制效应。其中随给药时间延长,对CYP1A1活性抑制程度增加,表现为时间依赖性抑制,同时抑制程度也与剂量有

关;对CYP2E1活性的影响表现为剂量依赖性抑制,抑制率可高达53.2%(P < 0.01);50 mg·kg⁻¹组对CYP3A活性的抑制程度随给药时间延长而增加,最大抑制率为34.3%(P < 0.01)。18α-GL对细胞色素P450总量和AMN的代谢无显著影响。

2 对大鼠肝脏微粒体 II 相酶活性的影响

Tab 2 Effects of 18α-glycyrrhizic acid (18α-GL) given ip on rat liver phase II transferase activities

Dose/ mg·kg ⁻¹	Time/ d	GT ₁ /		GT ₂ /		GST/	
		nmol·min ⁻¹ ·mg ⁻¹	% [#]	nmol·min ⁻¹ ·mg ⁻¹	% [#]	μmol·min ⁻¹ ·mg ⁻¹	% [#]
0	3	59±6	-	24±6	-	140±40	-
	6	62±6	-	21±8	-	130±26	-
	12	64±5	-	23±7	-	150±40	-
12.5	3	73±5 ^{**}	24.9	27±6	13.9	163±33	16.6
	6	74±5 ^{**}	19.3	30±5 [*]	45.9	148±31	13.7
	12	82±6 ^{**}	28.3	33±7 ^{**△}	46.3	192±23 [*]	37.1
50.0	3	75±9 [*]	27.6	32±7 [*]	56.9	174±28	24.2
	6	79±13 ^{**}	27.1	36±8 ^{**}	70.3	193±21 ^{**△△}	48.3
	12	83±7 ^{**}	29.9	38±8 ^{**}	67.0	213±34 ^{*△△}	42.5

Daily doses of 18α-GL (12.5 or 50.0 mg·kg⁻¹ b. w. ip) were given to male Wistar rats for 3, 6 or 12 consecutive days. Liver microsomes were prepared, and then the activities of glutathione S-transferase (GST) and UDP-glucuronosyltransferase toward 7-hydroxy-4-methylcoumarin (GT₁) and 4-phenylphenol (GT₂) were assayed

n = 6, $\bar{x} \pm s$. * P < 0.05, ** P < 0.01 vs their corresponding controls, [△] P < 0.05, ^{△△} P < 0.01 vs 18α-GL ip for 3 days group. [#] The percent of increase over controls

由表 2 可见, 18α -GL 对 II 相酶 (GT_1 , GT_2 和 GST) 活性均有诱导作用。其中, 18α -GL 可使 GT_1 活性增加 23.8% - 29.9%, 但不表现明显的时间及剂量关系。两个剂量组在第 6 d 对 GT_2 活性产生明显的诱导效应, 酶活性分别较对照组显著增加 45.9% ($P < 0.05$) 和 70.3% ($P < 0.01$)。大剂量组较小剂量组对 GST 活性的诱导作用显著, 并于 d 6 达最大效应。

讨 论

甘草是临床上常用的中药, 也是中药组方中的常用成分, 其制备方法和组分不同对肝脏药物代谢酶系统的影响较为复杂。谭毓治等(1986)报道生甘草诱导小鼠肝细胞色素 P450, 炙甘草无作用。Paolini 等^[3]报道甘草水溶性提出物和其天然成分甘草酸诱导肝脏 CYP3A, CYP1A2 和 CYP2B1 活性, 而对 CYP1A1 和 CYP2E1 活性有抑制作用。本文结果表明从天然甘草中差向异构筛选而得的有效单体 18α -GL 可抑制肝脏 CYP2E1, CYP1A1 和 CYP3A 活性, 对 II 相酶活性 (GT_1 , GT_2 和 GST) 却有诱导作用。

已知 CYP2E1 主要参与小分子物质(乙醇、丙酮、醋氨酚、 CCl_4 等)的氧化代谢, 在多种肝毒物活化中起着重要的催化作用。文献报道 18α -GL 对多种肝毒剂所致的肝脏损伤有干预作用, 其剂量与疗效呈正相关。本文结果可见 18α -GL 对 CYP2E1 活性的抑制表现为明显的时间和剂量依赖性, 18α -GL 减少肝毒物活化可能是其抗肝损伤作用的机制之一。文献报道^[11]CYP1A 水平是化学致癌作用的有效指征。 18α -GL 可能通过抑制 CYP1A1 活性减少前致癌物的活化从而具有化学性预防肝癌的作用。CYP3A 参与临床大多数口服药物的代谢, ERD 是其标志酶。本研究中 18α -GL 可使 ERD 活性降低, 说明其对 CYP3A 活性有抑制作用。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有可能产生药物相互作用。

GT 在机体解毒过程中起着重要的作用, 带有羟基、羧基及氨基的底物均可与葡糖醛酸结合形成水溶性复合物随尿或胆汁排出体外。据报道 GT 可分为两大类型: (1) 3-甲基胆蒎型 (GT_1), 该型可被

3-甲基胆蒎诱导, 其底物分子量小, 如 4-溴酚, 1-萘, 7-羟基-4-甲基香豆素等; (2) 苯巴比妥型 (GT_2), 该型可被苯巴比妥诱导, 其底物分子量较大, 如甾体类, 儿茶酚类, 吗啡, 4-羟基联苯等。本文结果表明 18α -GL 对 3-甲基胆蒎型和苯巴比妥型的葡糖醛酸结合反应酶均有诱导作用。 18α -GL 既抑制“增毒”的细胞色素 P450 同工酶活性, 减少毒物和致癌物的代谢活化, 又显著诱导 II 相酶活性, 加快毒物和致癌物的排泄, 这也许是“甘草解百药毒”的一个方面, 其临床意义和分子生物学机制有待进一步阐明。

REFERENCES:

- [1] Wu XM, Lu J, Li BR, *et al.* Therapeutic effects of epimeric glycyrrhizic acids on hepatic injury in rats [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 1992, **13**(4): 370 - 374.
- [2] Shiota G, Harada K, Ishida M, *et al.* Inhibition of hepatocellular carcinoma by glycyrrhizin in diethylnitrosamine-treated mice [J]. *Carcinogenesis*, 1999, **20**(1): 59 - 63.
- [3] Paolini M, Pozzetti L, Sapone A, *et al.* Effect of licorice and glycyrrhizin on murine liver CYP-dependent monooxygenases [J]. *Life Sci*, 1998, **62**(6): 571 - 582.
- [4] Omura T, Sato R. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes [J]. *J Biol Chem*, 1964, **239**(10): 2370 - 2378.
- [5] Burke MD, Prough RA, Mayer RT. Characteristics of a microsomal cytochrome P448 mediated reaction. Ethoxyresorufin O-deethylation [J]. *Drug Metab Dispos*, 1977, **5**(1): 1 - 8.
- [6] Peng RX, Wang YS, Lei SB, *et al.* Characterization of monooxygenase system in Chinese fetal adrenal gland [J]. *Asian Pac J Pharmacol*, 1994, **9**(1): 195 - 200.
- [7] 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.
- [8] Lei SB, Peng RX. Subcellular distribution of glutathione S-transferase in Chinese fetal liver [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 1990, **511**(2): 389 - 394.
- [9] Werner L, Autar KW, Karl WB. Differential induction of rat liver microsomal UDP-glucuronosyltransferase activities by various inducing agents [J]. *Biochem Pharmacol*, 1982, **31**(6): 907 - 913.
- [10] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, *et al.* Protein measurement with the Folin-phenol reagent [J]. *J Biol Chem*, 1951, **193**(1): 265 - 275.
- [11] Beresford AP. CYP1A1: friend or foe [J]? *Drug Metab Rev*, 1993, **25**(4): 503 - 517.

EFFECTS OF 18 α -GLYCYRRHIZIC ACID ON RAT LIVER CYTOCHROME P450 ISOENZYMES AND PHASE II TRANSFERASE

YANG Jing¹, PENG Renxiu¹, KONG Rui¹, YU Jieping²

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

ABSTRACT: AIM To study the effect of 18 α -glycyrrhizic acid (18 α -GL) on hepatic microsomal drug metabolizing enzymes in rats. **METHODS** 18 α -GL (12.5, 50.0 mg·kg⁻¹·d⁻¹) were given ip to male Wistar rats for 3, 6 or 12 consecutive days. The rats were sacrificed 24 h after the last dose and the liver microsomes were prepared for analysis of cytochrome P450 (CYP) isozymes and phase II transferase activities. **RESULTS** Aniline hydroxylase (CYP2E1) activities in the rats treated with 18 α -GL (12.5, 50.0 mg·kg⁻¹) for 6 days decreased dose-dependently by up to 53.2%; For 3, 6 or 12 days 7-ethoxyresorufin O-deethylase (CYP1A1) activities in the rats of 50 mg·kg⁻¹ dose group decreased time-dependently by 17.6%, 38.3% and 47.3%, respectively; Erythromycin N-demethylase (CYP3A) activities was significantly inhibited from 23.1% to 34.3%. UDP-glucuronosyltransferase activities toward 7-hydroxy-4-methylcoumarin significantly increased ranging from 19.3% to 29.9%. UDP-glucuronosyltransferase activities toward 4-phenylphenol in the rats treated with 18 α -GL (12.5, 50.0 mg·kg⁻¹) for 6 days increased by 45.9% and 70.3%. Glutathione S-transferase (GST) activities in the rats treated with 18 α -GL (12.5, 50.0 mg·kg⁻¹) for 6 days increased by 13.7% and 48.3% in dose-dependent manner. **CONCLUSION** 18 α -GL inhibited rat liver microsomal cytochrome P450 while induced phase II transferase.

KEY WORDS: 18 α -glycyrrhizic acid; cytochrome P450; phase II transferase